

日本国特許庁
JAPAN PATENT OFFICE

PCT/JP03/08551
#2

04.07.03

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日
Date of Application:

2002年 7月 5日

REC'D 22 AUG 2003

出願番号
Application Number:

特願2002-196821

WIPO PCT

[ST. 10/C] :

[JP2002-196821]

出願人

Applicant(s):

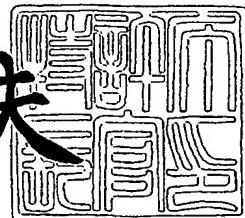
梶原 康宏
大塚化学株式会社

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2003年 8月 7日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今井 康夫



【書類名】 特許願

【整理番号】 S20212

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C07K 2/00

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県横浜市都筑区牛久保東2-4-2-205

【氏名】 梶原 康宏

【特許出願人】

【住所又は居所】 神奈川県横浜市都筑区牛久保東2-4-2-205

【氏名又は名称】 梶原 康宏

【特許出願人】

【識別番号】 000206901

【氏名又は名称】 大塚化学株式会社

【代理人】

【識別番号】 100081536

【弁理士】

【氏名又は名称】 田村 巍

【電話番号】 06-6864-3137

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 020086

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9712634

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 糖鎖アスパラギンを有する糖ペプチドの製造法及び該糖ペプチド

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 (1) 水酸基を有する樹脂(レジン)の水酸基と、脂溶性保護基でアミノ基窒素が保護されたアミノ酸のカルボキシル基をエステル化反応させ、

(2) 上記脂溶性保護基を脱離して遊離アミノ基を形成させ、

(3) この遊離アミノ基と、脂溶性保護基でアミノ基窒素が保護されたアミノ酸のカルボキシル基とアミド化反応させ、

(4) 上記脂溶性保護基を脱離して遊離アミノ基を形成させ、

(5) 上記(3)及び(4)の工程を1回以上繰り返し、

(6) 脂溶性保護基でアミノ基窒素が保護された糖鎖アスパラギンのアスパラギン部分のカルボキシル基とアミド化反応させ、

(7) 上記脂溶性保護基を脱離して遊離アミノ基を形成させ、

(8) この遊離アミノ基と、脂溶性保護基でアミノ基窒素が保護されたアミノ酸のカルボキシル基とアミド化反応させ、

(9) 上記(7)及び(8)の工程を1回以上繰り返し

(10) 上記脂溶性保護基を脱離して遊離アミノ基を形成させ、

(11) 酸で樹脂(レジン)を切断することを特徴とする少なくとも1以上の糖鎖アスパラギンをペプチド鎖の任意の位置に有する糖ペプチドの製造法。

【請求項 2】 (6)の、脂溶性保護基でアミノ基窒素が保護された糖鎖アスパラギンのアスパラギン部分のカルボキシル基とアミド化反応させ、(7)の、上記脂溶性保護基を脱離して遊離アミノ基を形成させる工程を、適宜追加する少なくとも2以上の糖鎖アスパラギンをペプチド鎖の任意の位置に有する糖ペプチドの製造法。

【請求項 3】 (6)の、脂溶性保護基でアミノ基窒素が保護された糖鎖アスパラギンのアスパラギン部分のカルボキシル基とアミド化反応させ、(7)の、上記脂溶性保護基を脱離して遊離アミノ基を形成させる工程を、最終工程で行

う少なくとも 1 以上の糖鎖アスパラギンをペプチド鎖に有する糖ペプチドの製造法。

【請求項 4】 (6) の工程に代えて、或いは (6) の工程に加えて、(1) 水酸基を有する樹脂（レジン）の水酸基と、脂溶性保護基でアミノ基窒素が保護された糖鎖アスパラギンのアスパラギン部分のカルボキシル基をエステル化反応させる、請求項 1 記載の糖ペプチドの製造法。

【請求項 5】 請求項 1 (6) の糖鎖アスパラギンが、6 以上の糖残基を有するものである請求項 1 ~ 4 に記載の糖ペプチドの製造法。

【請求項 6】 請求項 1 (6) の糖鎖アスパラギンが、9 ~ 11 の糖残基を有するものである請求項 1 ~ 4 に記載の糖ペプチドの製造法。

【請求項 7】 請求項 1 (6) の糖鎖アスパラギンが、6 以上の糖残基を有し、2 分岐型糖鎖を結合したものである請求項 1 ~ 4 に記載の糖ペプチドの製造法。

【請求項 8】 請求項 1 (6) の糖鎖アスパラギンが、ジシアロ糖鎖アスパラギンもしくはモノシアロ糖鎖アスパラギンであって、該シアル酸のカルボキシル基が保護基により保護されたものである請求項 1 ~ 4 に記載の糖ペプチドの製造法。

【請求項 9】 請求項 1 (6) の糖鎖アスパラギンが、シアロ糖鎖アスパラギンである請求項 1 ~ 4 に記載の糖ペプチドの製造法。

【請求項 10】 シアル酸のカルボキシル基の保護基がベンジル基である請求項 8 記載の糖ペプチドの製造法。

【請求項 11】 脂溶性保護基が 9 - フルオレニルメトキシカルボニル (Fmoc) 基である請求項 1 ~ 4 記載の糖ペプチドの製造法。

【請求項 12】 糖鎖アスパラギンの一部又は全部の代わりにムチン結合型糖鎖を用いる請求項 1 ~ 11 記載の糖ペプチドの製造法。

【請求項 13】 請求項 1 ~ 12 に記載の製造法により、取得可能な少なくとも 1 以上の糖鎖アスパラギンまたはムチン結合型糖鎖をペプチド鎖の任意の位置に有する糖ペプチド。

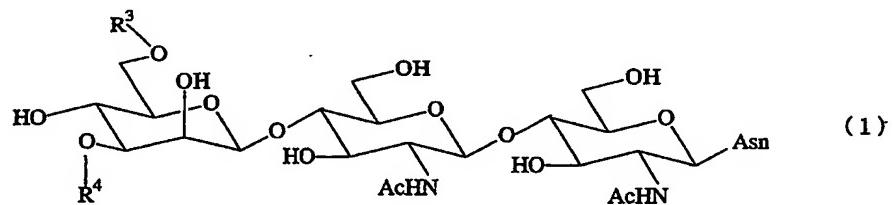
【請求項 14】 糖鎖アスパラギンまたはムチン結合型糖鎖が、6 以上の糖

残基を有し、2分岐型糖鎖を結合したものである請求項13記載の糖ペプチド。

【請求項15】 糖鎖アスパラギンとしてジシアロ糖鎖アスパラギン、モノシアロ糖鎖アスパラギン及びアシアロ糖鎖アスパラギンから選ばれる少なくとも1種以上を結合したシアリルグリコペプチド（SGP）である請求項13記載の糖ペプチド。

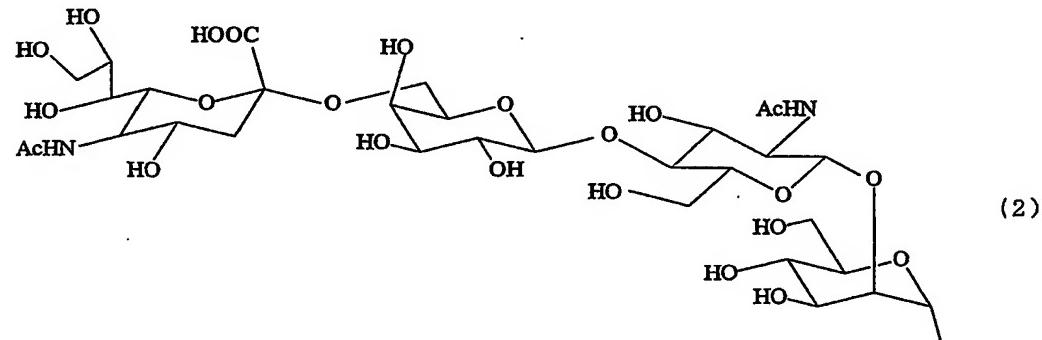
【請求項16】 糖鎖アスパラギンが式（1）で表されるものである請求項13記載の糖ペプチド。

【化1】

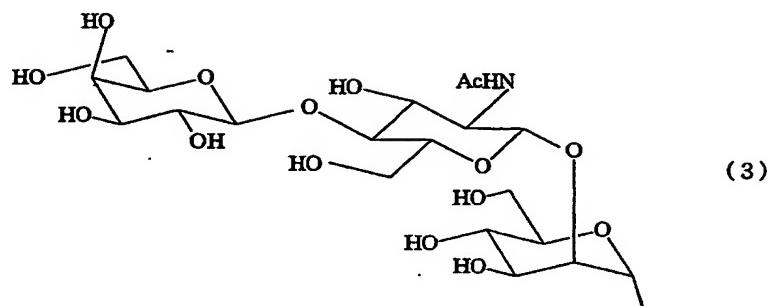


[式中、R³およびR⁴は、水素原子、式（2）～（5）で示される基であり、同一でも異なっていてもよい。ただし、R³およびR⁴が共に式（2）または式（3）である場合を除く。]

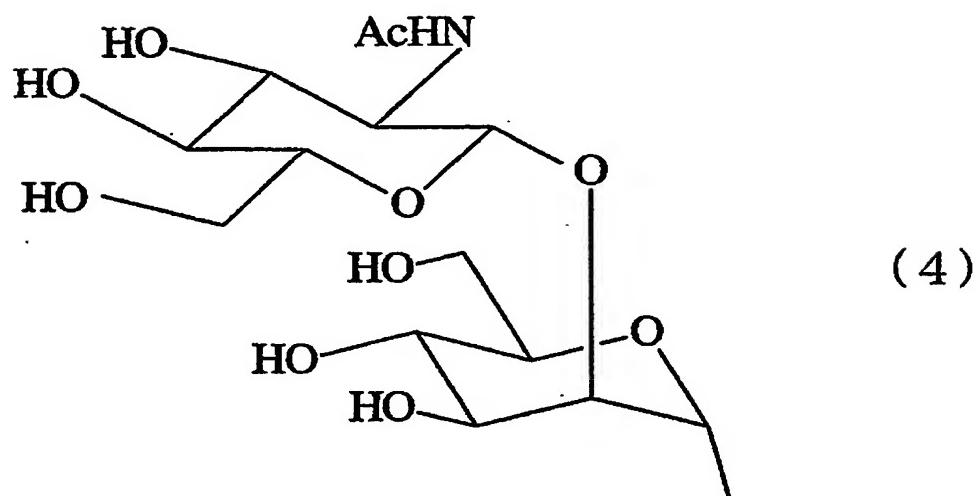
【化2】



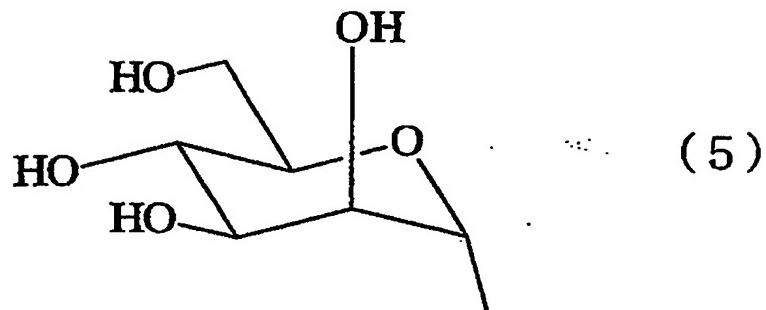
【化3】



【化4】



【化5】



【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は糖鎖アスパラギンを有する糖ペプチドの製造法及び該製造法により取得可能な糖ペプチドに関する。

【0002】

【従来の技術】

近年、核酸（DNA）、タンパク質に続く第三の鎖状生命分子として、糖鎖分子が注目されてきている。ヒトの体は、約60兆個の細胞から成っている一大細胞社会であり、全ての細胞表面は糖鎖分子によって覆われている。例えば、ABO式血液型は細胞表面の糖鎖の違いにより決定されている。

糖鎖は、細胞間の認識や相互作用に関わる働きをもち、細胞社会を成り立たせる要となっている。細胞社会の乱れは、癌、慢性疾患、感染症、老化などにつながる。

【0003】

例えば、細胞が癌化すると糖鎖の構造変化が起こることが分かっている。また、コレラ菌やインフルエンザウイルスなどは、ある特定の糖鎖を認識し結合することにより、細胞に侵入し感染することが知られている。

糖鎖機能の解明は、新しい原理に基づく医薬品や食品の開発などをもたらし、病気の予防、治療に貢献するなど、幅広い応用が期待されている。

糖鎖は単糖の配列、結合様式・部位、鎖の長さ・分岐様式、全体の高次構造などの多様性から、核酸やタンパク質の構造と比べると非常に複雑な構造である。従って、その構造に由来する生物学的な情報は核酸やタンパク質に比べて多種多様である。糖鎖は、研究の重要性を認識されながらも、その構造の複雑さや多様性により、核酸やタンパク質に比べて研究の推進が遅れている状況にある。

上記のように細胞膜表面や血清などに存在するタンパク質の多くは糖鎖が結合している。糖鎖がタンパク質に共有結合した分子は糖タンパク質とよばれ、糖とタンパク質との結合様式の違いから2つのグループに分けることができる。一つはアスパラギン（Asn）の側鎖のアミノ基と糖鎖が結合したアスパラギン結合型糖鎖（N-グリコシド結合型）である。もう一方はセリン（Ser）やトレオニン（Thr）のアルコールに糖鎖が結合したムチン結合型糖鎖（O-グリコシ

ド結合型)である。すべてのアスパラギン結合型糖鎖は5つの糖残基からなる基本骨格をもち、結合する糖鎖の非還元末端の糖残基の種類によって高マンノース型、複合型、混成型のサブグループに分類される。一方ムチン結合型糖鎖は基本骨格(コア)の違いから4グループに分類される。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】

ペプチド合成法として現在広く用いられているのは、1963年にR. B. Merrifieldによって開発された固相合成法である。固相合成法は樹脂(レジン)とよばれる固相上にアミノ酸をつなげ、ペプチド鎖を伸長していく。ペプチド鎖の伸長が終了したら、固相からペプチド鎖を切り出し、目的物を得る。この応用としてペプチド鎖伸長の際、糖鎖を結合させたアミノ酸を組み込むことで糖ペプチド鎖の合成が可能となる。

そこでAsnやSer(Thr)に糖鎖を結合させた糖鎖アミノ酸をペプチド合成に応用し、糖ペプチド鎖の合成が盛んに行なわれるようになった。しかし化学合成の技術進歩にもかかわらず大きな糖鎖を持ったペプチド鎖を化学的に合成した例は少ない。

【0005】

そのひとつめの問題点として、アスパラギン残基と結合させる糖鎖の絶対量の不足である。糖鎖を得る手段として、生体内に存在する糖タンパク質から糖鎖だけを遊離させる方法がある。しかし糖タンパク質から糖鎖を切り出す際に用いる、ヒドラジンは危険であり、大量に糖鎖を合成するのは困難である。また生体内には構造が酷似した糖鎖が多く存在し、単一の糖鎖のみを得るのは難しい。さらにヒドラジン分解により糖鎖とアスパラギン残基が解離するため、遊離させた糖鎖とアスパラギン残基を再び結合させなくてはならないので、行程数が増えてしまう。

また糖鎖を化学合成により合成する場合、10個程度の糖残基が連結した糖鎖を合成された例はあるが、その多くが、目的物である糖鎖を1年間で数ミリグラム程度しか合成できていない。このため化学合成により糖鎖を得るのは困難となっている。

【0006】

ふたつめの問題として、ペプチド固相合成の後にペプチド鎖を固相から切り出すためのTFA（トリフルオロ酢酸）処理である。例えば糖鎖の非還元末端に存在するシアル酸は酸性条件下で容易に加水分解されてしまうため、TFA処理によってシアル酸が合成した糖ペプチドから切りはなされてしまう可能性がある。このためにシアル酸を有する糖鎖を固相合成に用いた例はほとんどない。この問題の解決法として、ペプチド合成後にシアル酸転移酵素によりシアル酸を、糖鎖に転移させる方法が報告されている。しかしこの方法はシアル酸を導入する方法としては有用であるが、糖転移酵素が高価であるため、糖ペプチドの大量合成は困難という問題も残っている。

【0007】

本発明の課題は少なくとも1以上の糖鎖アスパラギンまたはムチン結合型糖鎖をペプチド鎖の任意の位置に有する糖ペプチドを人工的に容易に大量に合成可能な糖ペプチドの製造法を提供することにある。

また本発明の課題はシアル酸を有する糖鎖アルパラギンであっても、酸処理によってシアル酸が糖ペプチドから切断されず、容易にシアリル糖ペプチドを得る方法を提供することにある。

また本発明の課題は糖残基が任意に除去された各種の新規な糖鎖アスパラギンの少なくとも1以上をペプチド鎖の任意の位置に有する糖ペプチドを人工的に容易に大量に合成可能な糖ペプチドの製造法を提供することにある。

また本発明の課題は、上記各種の糖ペプチドの製造法により、取得可能な糖ペプチドを提供することにある。

【0008】**【課題を解決するための手段】**

本発明は（1）水酸基を有する樹脂（レジン）の水酸基と、脂溶性（fat-soluble）保護基でアミノ基を保護されたアミノ酸のカルボキシル基をエステル化反応させ、

（2）上記脂溶性保護基を脱離して遊離アミノ基を形成させ、

（3）この遊離アミノ基と、脂溶性保護基でアミノ基を保護されたアミノ酸

のカルボキシル基とアミド化反応させ、

(4) 上記脂溶性保護基を脱離して遊離アミノ基を形成させ、

(5) 上記(3)及び(4)の工程を1回以上繰り返し、

(6) 脂溶性保護基でアミノ基を保護された糖鎖アスパラギンのアスパラギン部分のカルボキシル基とアミド化反応させ、

(7) 上記脂溶性保護基を脱離して遊離アミノ基を形成させ、

(8) この遊離アミノ基と、脂溶性保護基でアミノ基を保護されたアミノ酸のカルボキシル基とアミド化反応させ、

(9) 上記(7)及び(8)の工程を1回以上繰り返し

(10) 上記脂溶性保護基を脱離して遊離アミノ基を形成させ、

(11) 酸で樹脂(レジン)を切断することを特徴とする少なくとも1以上の糖鎖アスパラギンをペプチド鎖の任意の位置に有する糖ペプチドの製造法に係る。

【0009】

本発明は(6)の、脂溶性保護基でアミノ基を保護された糖鎖アスパラギンのアスパラギン部分のカルボキシル基とアミド化反応させ、(7)の、上記脂溶性保護基を脱離して遊離アミノ基を形成させる工程を、適宜追加する少なくとも2以上の糖鎖アスパラギンをペプチド鎖の任意の位置に有する糖ペプチドの製造法に係る。

本発明は(6)の、脂溶性保護基でアミノ基を保護された糖鎖アスパラギンのアスパラギン部分のカルボキシル基とアミド化反応させ、(7)の、上記脂溶性保護基を脱離して遊離アミノ基を形成させる工程を、最終工程で行う少なくとも1以上の糖鎖アスパラギンをペプチド鎖に有する糖ペプチドの製造法に係る。

【0010】

本発明は(6)の工程に代えて、或いは(6)の工程に加えて、(1)水酸基を有する樹脂(レジン)の水酸基と、脂溶性保護基でアミノ基を保護された糖鎖アスパラギンのアスパラギン部分のカルボキシル基をエステル化反応させる、糖ペプチドの製造法に係る。

本発明は(6)の糖鎖アスパラギンが、6以上の糖残基を有するものである糖

ペプチドの製造法に係る。

本発明は(6)の糖鎖アスパラギンが、9～11の糖残基を有するものである糖ペプチドの製造法に係る。

本発明は(6)の糖鎖アスパラギンが、6以上の糖残基を有し、2分岐型糖鎖を結合したものである糖ペプチドの製造法に係る。

本発明は(6)の糖鎖アスパラギンが、ジシアロ糖鎖アスパラギンもしくはモノシアロ糖鎖アスパラギンであって、該シアル酸のカルボキシル基が保護基により保護されたものである記載の糖ペプチドの製造法に係る。

本発明は(6)の糖鎖アスパラギンが、アシアロ糖鎖アスパラギンである糖ペプチドの製造法に係る。

【0011】

本発明は糖鎖アスパラギンの一部又は全部の代わりにムチン結合型糖鎖を用いる糖ペプチドの製造法に係る。

本発明は上記製造法により、取得可能な少なくとも1以上の糖鎖アスパラギンまたはムチン結合型糖鎖をペプチド鎖の任意の位置に有する糖ペプチドに係る。

本発明は糖鎖アスパラギンまたはムチン結合型糖鎖が、6以上の糖残基を有し、2分岐型糖鎖を結合したものである糖ペプチドに係る。

本発明は糖鎖アスパラギンとしてジシアロ糖鎖アスパラギン、モノシアロ糖鎖アスパラギン及びアシアロ糖鎖アスパラギンから選ばれる少なくとも1種以上を結合したシリルグリコペプチド(SGP)である糖ペプチドに係る。

【0012】

本発明者は、先に特願2001-185685号(以下、先願という)において、種々の単離された糖鎖アスパラギン誘導体を従来に比べて非常に容易かつ大量に得ることができる、糖鎖アスパラギン誘導体、糖鎖アスパラギン、糖鎖の製造方法、更には糖残基が任意に欠失した糖鎖が結合した新規な糖鎖アスパラギン誘導体、糖鎖アスパラギン、糖鎖を開発した。

【0013】

この先願の方法は例えば

- (1) (a) 1種もしくは2種以上の糖鎖アスパラギンを含む混合物に含まれ

る該糖鎖アスパラギンに脂溶性の保護基を導入して糖鎖アスパラギン誘導体混合物を得る工程、

ならびに

(b) 該糖鎖アスパラギン誘導体混合物または該糖鎖アスパラギン誘導体混合物に含まれる糖鎖アスパラギン誘導体を加水分解して得られる混合物をクロマトグラフィーに供して各糖鎖アスパラギン誘導体を分離する工程、

を含む、糖鎖アスパラギン由来の糖鎖アスパラギン誘導体の製造方法、

(2) (b') 工程 (b) で分離された糖鎖アスパラギン誘導体を糖加水分解酵素を用いて加水分解する工程をさらに含む前記 (1) 記載の糖鎖アスパラギン誘導体の製造方法、

(3) 1種もしくは2種以上の糖鎖アスパラギンを含む混合物が、下記式 (A) の化合物および／または該化合物において1以上の糖残基が欠失した化合物を含むものである、前記 (1) または (2) 記載の糖鎖アスパラギン誘導体の製造方法、

(4) 脂溶性の保護基がフルオレニルメトキシカルボニル (Fmoc) 基である前記 (1) ~ (3) いずれか記載の糖鎖アスパラギン誘導体の製造方法、

(5) 工程 (a) が、非還元末端にシアル酸残基を有する1種もしくは2種以上の糖鎖アスパラギンを含む混合物に含まれる該糖鎖アスパラギンにFmoc基を導入し、かつシアル酸残基にベンジル基を導入して糖鎖アスパラギン誘導体混合物を得る工程である、前記 (1) ~ (3) いずれか記載の糖鎖アスパラギン誘導体の製造方法、

(6) (a) 1種もしくは2種以上の糖鎖アスパラギンを含む混合物に含まれる該糖鎖アスパラギンに脂溶性の保護基を導入して糖鎖アスパラギン誘導体混合物を得る工程、

(b) 該糖鎖アスパラギン誘導体混合物または該糖鎖アスパラギン誘導体混合物に含まれる糖鎖アスパラギン誘導体を加水分解して得られる混合物をクロマトグラフィーに供して各糖鎖アスパラギン誘導体を分離する工程、ならびに

(c) 工程 (b) で分離された糖鎖アスパラギン誘導体の保護基を除去して糖鎖アスパラギンを得る工程、

を含む、糖鎖アスパラギンの製造方法、

(7) (b') 工程 (b) で分離された糖鎖アスパラギン誘導体を糖加水分解酵素を用いて加水分解する工程、および／または

(c') 工程 (c) で得られた糖鎖アスパラギンを糖加水分解酵素を用いて加水分解する工程、

をさらに含む、前記 (6) 記載の糖鎖アスパラギンの製造方法、

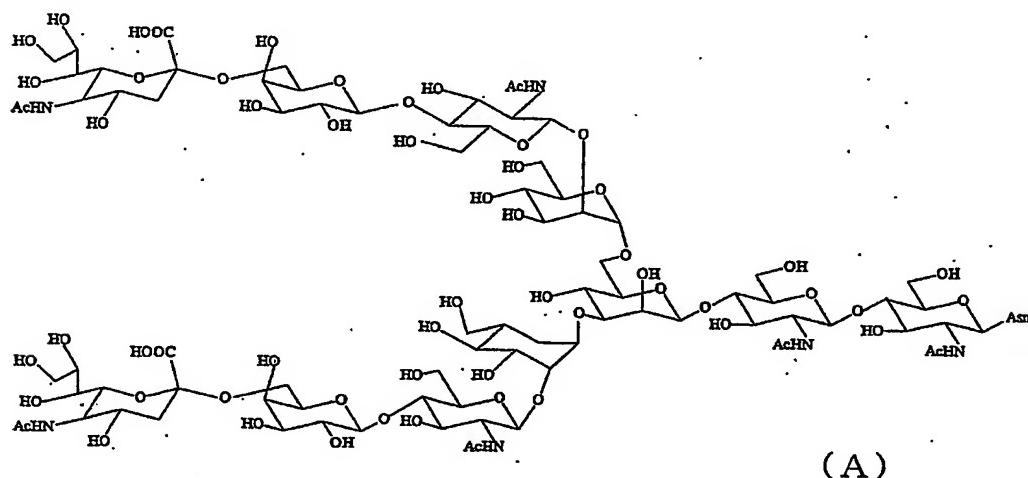
(8) 1種もしくは2種以上の糖鎖アスパラギンを含む混合物が、下記式 (A) の化合物および／または該化合物において1以上の糖残基が消失した化合物を含むものである、前記 (6) または (7) 記載の糖鎖アスパラギンの製造方法、

(9) 脂溶性の保護基がFmoc基である前記 (6) ~ (8) いずれか記載の糖鎖アスパラギンの製造方法、

(10) 工程 (a) が、非還元末端にシアル酸残基を有する1種もしくは2種以上の糖鎖アスパラギンを含む混合物に含まれる該糖鎖アスパラギンにFmoc基を導入し、かつシアル酸残基にベンジル基を導入して糖鎖アスパラギン誘導体混合物を得る工程である、前記 (6) ~ (8) いずれか記載の糖鎖アスパラギンの製造方法などである。

【0014】

【化6】

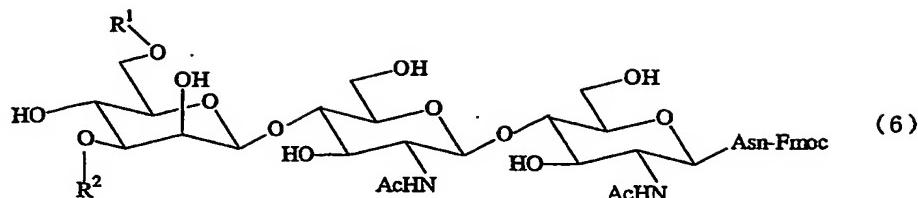


【0015】

ここで上記糖鎖アスパラギン誘導体は例えば式 (6) で表される。

【0016】

【化7】

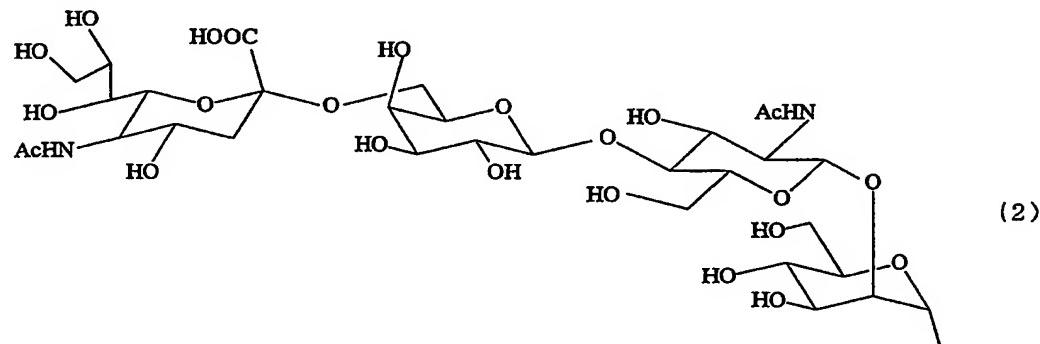


【0017】

[式中、R¹およびR²は、水素原子、式（2）～（5）で示される基であり、同一でも異なっていてもよい。ただし、R¹およびR²が共に式（3）である場合を除く。]

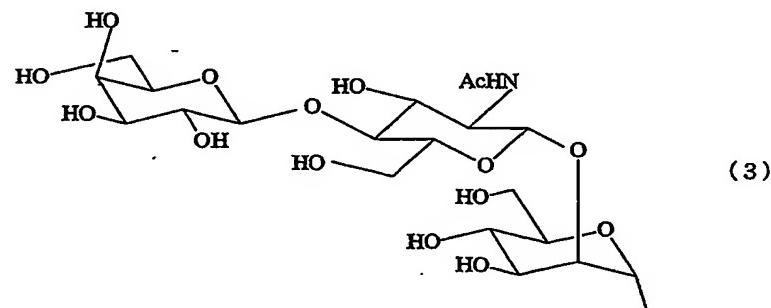
【0018】

【化8】



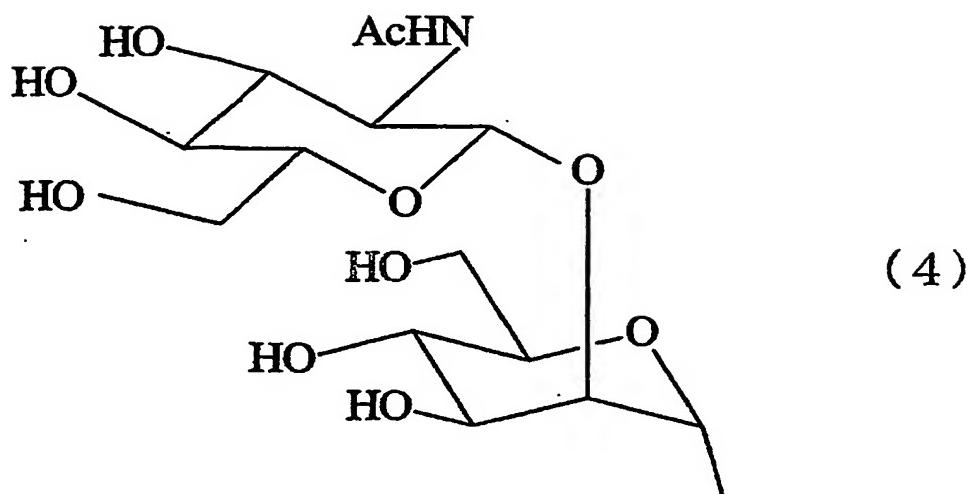
【0019】

【化9】



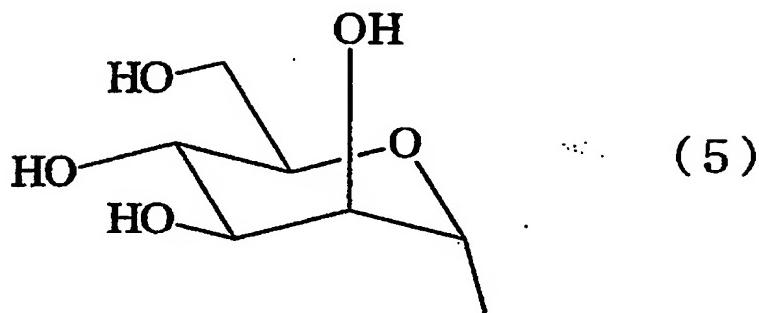
【0020】

【化10】



【0021】

【化11】

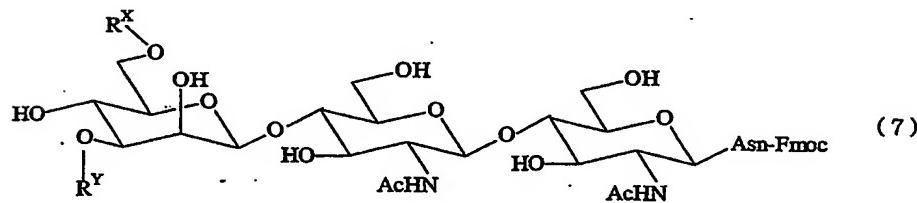


【0022】

また上記他の糖鎖アスパラギン誘導体は例えば式（7）で表される。

【0023】

【化12】

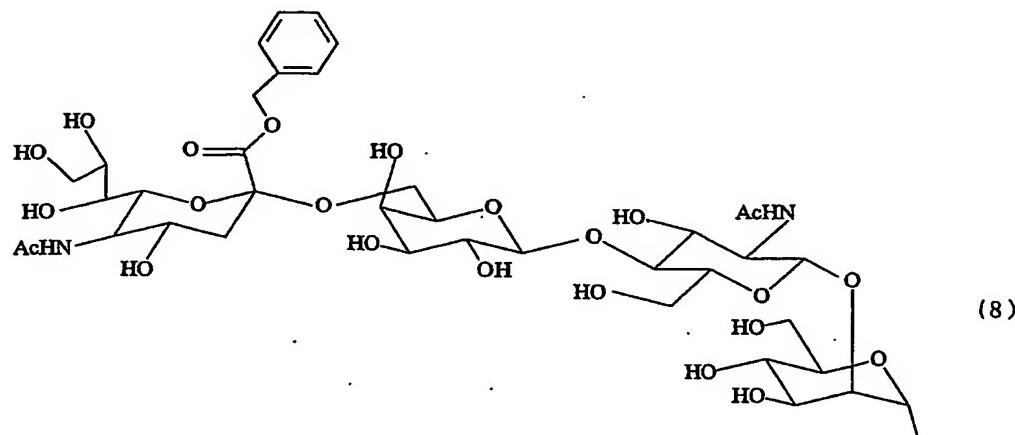


【0024】

[式中、R_XおよびR_Yは、一方が式(8)で示される基であり、他方が、水素原子、式(8)、または式(2)～(5)で示される基である。]

【0025】

【化13】

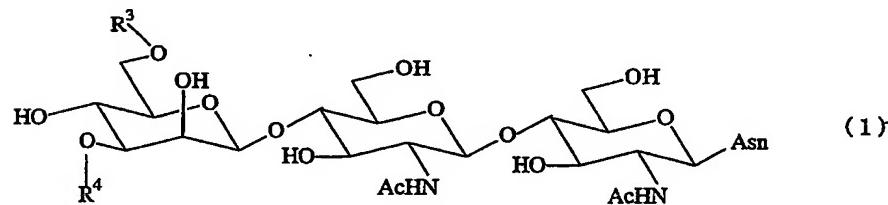


【0026】

また上記糖鎖アスパラギンは例えば式(1)で表される。

【0027】

【化14】



【0028】

[式中、R₃およびR₄は、水素原子、式(2)～(5)で示される基であり、同一でも異なっていてもよい。ただし、R₃およびR₄が共に式(2)または式(3)である場合を除く。]

【0029】

これら糖鎖アスパラギン誘導体及び糖鎖アスパラギンの製造についての詳細は、上記先願に述べられているので、これを引用する。しかし若干先願の内容について述べると、先願の糖鎖アスパラギン誘導体の製造方法は、たとえば、天然の

糖タンパク質に由来する糖鎖アスパラギン、好ましくはアスパラギン結合型糖鎖から得られる糖鎖アスパラギンの混合物に含まれる当該糖鎖アスパラギンに脂溶性の保護基を導入（結合）して糖鎖アスパラギン誘導体の混合物を得た後に当該混合物を各糖鎖アスパラギン誘導体に分離することを1つの大きな特徴とする。なお、本明細書において、「糖鎖アスパラギン」とはアスパラギンが結合した状態の糖鎖をいう。また、「アスパラギン結合型糖鎖」とはタンパク質のポリペプチド中のアスパラギン（Asn）の酸アミノ基に、還元末端に存在するN-アセチルグルコサミンがN-グリコシド結合した糖鎖群であって、Man (β 1-4) GlcNAc (β 1-4) GlcNAcを母核とする糖鎖群をいう。「糖鎖アスパラギン誘導体」とはアスパラギン残基に脂溶性の保護基が結合した状態の糖鎖アスパラギンをいう。また、化合物の構造式中、「AcHN」はアセトアミド基を示す。

【0030】

前記するように、天然の糖タンパク質に由来する糖鎖は非還元末端の糖残基がランダムに欠失した糖鎖の混合物である。本発明者らは、意外にも天然の糖タンパク質に由来する糖鎖、具体的には糖鎖アスパラギンの混合物に含まれる当該糖鎖アスパラギンに脂溶性の保護基を導入することで、当該保護基が導入された糖鎖アスパラギン誘導体の混合物を公知のクロマトグラフィーの手法を用いて容易に個々の糖鎖アスパラギン誘導体に分離することができることを見出した。それにより、種々の構造を有する糖鎖アスパラギン誘導体をそれぞれ大量に調製することが可能となった。たとえば、従来分離が困難であった類似構造の糖鎖アスパラギン誘導体同士の分離が可能となり、それらの化合物を各々、容易かつ大量に調製することができる。また、得られた糖鎖アスパラギン誘導体を元に、たとえば、糖加水分解酵素を順次作用させて糖残基を除去することにより、さらに様々な糖鎖アスパラギン誘導体を合成することもできる。

【0031】

このように、糖鎖アスパラギンに脂溶性の保護基を導入して誘導体化することにより個々の糖鎖アスパラギン誘導体の分離が可能となったが、これは、脂溶性の保護基を導入したことにより糖鎖アスパラギン誘導体の全体の脂溶性が高まり

、たとえば、好適に使用される逆相系カラムとの相互作用が格段に向上了し、その結果、より鋭敏に糖鎖構造の差を反映して個々の糖鎖アスパラギン誘導体が分離されるようになったことによると考えられる。

さらに先願によれば、得られた糖鎖アスパラギン誘導体の保護基を除去することにより種々の糖鎖アスパラギンを、人工的に容易かつ大量に得ることができる。

本発明では上記先願で得られた各種の糖鎖アスパラギンを用いて、本発明の上記方法により、目的とする糖ペプチドを得るものである。

【0032】

【発明の実施の形態】

本発明の方法においては先ず、(1) 水酸基を有する樹脂(レジン)の水酸基と、脂溶性保護基でアミノ基窒素が保護されたアミノ酸のカルボキシル基をエステル化反応させる。

この場合アミノ酸のアミノ基窒素を脂溶性保護基で保護しているので、アミノ酸同士の自己縮合は防止され、レジンの水酸基とアミノ酸のカルボキシル基が反応してエステル化が起こる。

次に(2) 上記で得られたエ斯特ルの脂溶性保護基を脱離して遊離アミノ基を形成させ、

(3) この遊離アミノ基と、脂溶性保護基でアミノ基窒素が保護された任意のアミノ酸のカルボキシル基とアミド化反応させ、

(4) 上記脂溶性保護基を脱離して遊離アミノ基を形成させ、

(5) 上記(3)及び(4)の工程を1回以上繰り返すことにより、任意の数の任意のアミノ酸が連結した、末端にレジンを結合し、他端に遊離アミノ基を有するペプチドが得られる。

【0033】

(6) 次に、脂溶性保護基でアミノ基窒素が保護された糖鎖アスパラギンのアスパラギン部分のカルボキシル基と上記遊離アミノ基をアミド化反応させ、

(7) 更に上記脂溶性保護基を脱離して遊離アミノ基を形成させ、

(8) この遊離アミノ基と、脂溶性保護基でアミノ基窒素が保護された任意のア

ミノ酸のカルボキシル基とアミド化反応させ、

(9) 上記(7)及び(8)の工程を1回以上繰り返し、

(10) 上記脂溶性保護基を脱離して遊離アミノ基を形成させることにより、任意の数の任意のアミノ酸が連結した、末端にレジンを結合し、他端に遊離アミノ基を有し、中間に糖鎖アスパラギンを有するペプチドが得られる。

(11) そして、酸で樹脂(レジン)を切断することにより、糖鎖アスパラギンをペプチド鎖の任意の位置に有する糖ペプチドを製造することができる。

【0034】

更に、上記(6)の脂溶性保護基でアミノ基窒素が保護された糖鎖アスパラギンのアスパラギン部分のカルボキシル基と上記遊離アミノ基をアミド化反応させる工程を、適宜追加することにより少なくとも2以上の糖鎖アスパラギンをペプチド鎖の任意の位置に有する糖ペプチドを製造することができる。またこの時、異なる糖鎖アスパラギンを用いることにより2種以上の糖鎖アスパラギンをペプチド鎖の任意の位置に有する糖ペプチドを製造することもできる。

また、この糖鎖アスパラギンをペプチド鎖の端部に導入することもできる。

更には、糖鎖アスパラギンのようなアスパラギン結合型糖鎖の一部又は全部の代わりにムチン結合型糖鎖を用いることもできる。

本発明において水酸基を有する樹脂(レジン)としては、通常、固相合成で使用する水酸基を有する樹脂(レジン)であればよく、例えばWangレジン(メルク社製)、HMPA-PEGレジン(メルク社製)等を用いることができる。

【0035】

アミノ酸としては全てのアミノ酸を用いることができ、例えばセリン(Ser)、アスパラギン(Asn)、バリン(Val)、ロイシン(Leu)、イソロイシン(Ile)、アラニン(Ala)、チロシン(Tyr)、グリシン(Gly)、リジン(Lys)、アルギニン(Arg)、ヒスチジン(His)、アスパラギン酸(Asp)、グルタミン酸(Glu)、グルタミン(Gln)、スレオニン(Thr)、システイン(Cys)、メチオニン(Met)、フェニルアラニン(Phe)、トリプトファン(Trp)、プロリン(Pro)を挙げるこ

とができる。

【0036】

脂溶性保護基としては、例えば9-フルオレニルメトキシカルボニル(Fmoc)基、t-ブチルオキシカルボニル(Boc)基、ベンジル基、アリル基、アリルオキシカーボネート基、アセチル基などの、カーボネート系またはアミド系の保護基等を挙げることができる。脂溶性保護基を導入するには、例えばFmoc基を導入する場合には9-フルオレニルメチル-N-スクシニミジルカーボネートと炭酸水素ナトリウムを加えて反応を行うことにより導入できる。反応は0～50℃、好ましくは室温で、約1～5時間程度行うのが良い。

エステル化触媒として、例えば1-メチレンスルホニル-3-ニトロ-1,2,4-トリアゾール(MSNT)、ジシクロヘキシルカルボイミド(DCC)、ジイソプロピルカルボイミド(DIPCDI)などの脱水縮合剤を用いることができる。エステル化反応は例えば固相カラムにレジンを入れ、溶媒で洗浄し、その後アミノ酸の溶媒溶液を加えることにより行うのが好ましい。洗浄用溶媒としては、例えばジメチルホルムアミド(DMF)、2-プロパノール、塩化メチレン等を挙げることができる。アミノ酸を溶解するの溶媒としては、例えばジメチルスルホキシド(DMSO)、DMF、塩化メチレン等を挙げることができる。反応は0～50℃、好ましくは室温で、約1～5時間程度行うのが良い。

この時固相上の未反応のアミノ基を無水酢酸等を用いてアセチル化しキャッピングすることも好ましい。

【0037】

脂溶性保護基の脱離は、例えば塩基で処理することにより行うことができる。塩基としては、例えばピペリジン、モリホリン等を挙げることができる。その際、溶媒の存在下が行うのが好ましい。溶媒としては、例えばDMSO、DMF、メタノール等を挙げることができる。

遊離アミノ基と、脂溶性保護基でアミノ基窒素が保護された任意のアミノ酸のカルボキシル基とアミド化反応させる反応は、溶媒の存在下が行うのが好ましい。溶媒としては、例えばDMSO、DMF、塩化メチレン等を挙げることができる。反応は0～50℃、好ましくは室温で、約1～5時間程度行うのが良い。この

際にも固相上の未反応のアミノ基を無水酢酸等を用いてアセチル化しキャッピングするのが好ましい。脂溶性保護基の脱離は、上記と同様に行うことができる。

ペプチド鎖から樹脂（レジン）を切断するには酸で処理するのが好ましい。酸としては、例えばトリフルオロ酢酸（TFA）、弗化水素（HF）等を挙げることができる。

【0038】

本発明においては上記（6）の、脂溶性保護基でアミノ基窒素が保護された糖鎖アスパラギンのアスパラギン部分のカルボキシル基とアミド化反応させ、（7）の、上記脂溶性保護基を脱離して遊離アミノ基を形成させる工程を、適宜追加することにより、少なくとも2以上の糖鎖アスパラギンをペプチド鎖の任意の位置に有する糖ペプチドを製造することができる。

また本発明においては上記（6）の、脂溶性保護基でアミノ基窒素が保護された糖鎖アスパラギンのアスパラギン部分のカルボキシル基とアミド化反応させ、（7）の、上記脂溶性保護基を脱離して遊離アミノ基を形成させる工程を、最終工程で行うことにより、少なくとも1以上の糖鎖アスパラギンをペプチド鎖に有する糖ペプチドを製造することができる。

【0039】

また本発明においては上記（6）の工程に代えて、或いは（6）の工程に加えて、（1）水酸基を有する樹脂（レジン）の水酸基と、脂溶性保護基でアミノ基窒素が保護された糖鎖アスパラギンのアスパラギン部分のカルボキシル基をエステル化反応させることにより、端部に糖鎖アスパラギンを有する糖ペプチドを製造することができる。

本発明において用いる糖鎖アスパラギンは任意の数の糖残基を有するものが使用できるが、特に従来にない6以上の糖残基を有する糖鎖アスパラギンあるいはムチン結合型糖鎖を使用することもでき、本発明の特異な特徴を構成する。特に9～11の糖残基を有する糖鎖アスパラギンを使用することも可能である。

更には6以上の糖残基を有し、2分岐型糖鎖を結合した糖鎖アスパラギンを使用することも可能である。例えば糖鎖アスパラギンが、ジシアロ糖鎖アスパラギンもしくはモノシアロ糖鎖アスパラギンを使用することも可能である。このよう

なジシアロ糖鎖アスパラギンもしくはモノシアロ糖鎖アスパラギンが結合したシアリルグリコペプチド（SGP）は本発明の好ましい糖ペプチドである。

【0040】

糖鎖アスパラギンが、ジシアロ糖鎖アスパラギンもしくはモノシアロ糖鎖アスパラギンであって、該シアル酸のカルボキシル基が保護基により保護されたものを使用することも可能である。

糖鎖アスパラギンが、ジシアロ糖鎖アスパラギンもしくはモノシアロ糖鎖アスパラギンである場合、該シアル酸は酸により切断される恐れがあるので、上記のような該シアル酸のカルボキシル基が保護基により保護されたものは、該シアル酸が切断されることが防止され好ましい。この保護基としては、例えばベンジル基、アリル基、ジフェニルメチル基等を挙げることができる。

【0041】

シアル酸のカルボキシル基に保護基を導入する反応は、公知の方法、例えば Protective groups in Organic Chemistry, John Wiley & Sons INC., New York 1991, ISBN 0-471-62301-6 参照) により行うことができる。

本発明の糖ペプチドは医薬品開発等の分野において非常に有用である。たとえば、医薬品開発における応用例としては、たとえば、ガンのワクチン合成があげられる。細胞がガン化すると体内にはなかった糖鎖が発現することが知られている。また、当該糖鎖を化学的に合成し、ワクチンとして個体に投与すると、ガンの増殖が抑制されることも知られている。そこで、本発明により所望の糖ペプチドを製造することができれば、ガンの治療に有効なワクチンの合成を行うことが可能である。また、本発明により得られる糖ペプチドを、さらに化学的な反応および糖転移酵素による反応などを組み合わせて新たな糖残基を結合させて誘導体化し、新規なワクチンの合成を行うことも可能である。

【0042】

【実施例】

以下に実施例を挙げて説明するが、本発明はこれら実施例に限定されるものではない。

【0043】

まず、以下で用いるFmoc-Val、Fmoc-Leu、Fmoc-Leu-O_{pfp}、Fmoc-Ala、Fmoc-Ala-O_{pfp}、Fmoc-Val-O_{pfp}、Fmoc-Ser(Bz1)-OH、Fmoc-Ser(OtBu)は公知の物質であり、それぞれ購入したものを用いた。ここで例えば、Leu-O_{pfp}のO_{pfp}とは、ロイシン(Leu)のカルボキシル基がペンタフルオロフェニル(pfp)基により保護されたもの、Ser(Bz1)-OHとは、セリン(Ser)の水酸基がベンジル(Bz1)基により保護されたもの、Ser(O)とは、セリン(Ser)のOH基がt-ブチル(tBu)基により保護されたものを意味する。

【0044】

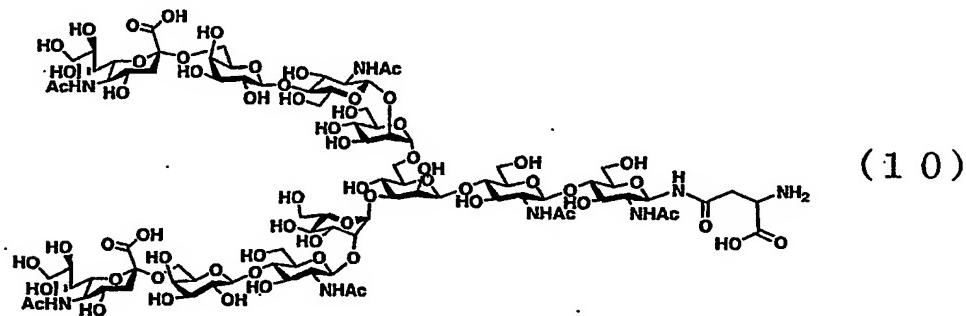
参考例1

ジシアロ糖鎖アスパラギン(10)の合成

粗精製のSGP(シアリルグリコペプチド)500mgとアジ化ナトリウム10mg($319\mu\text{mol}$)をトリス-塩酸・塩化カルシウム緩衝溶液(TRIZMA BASE 0.05mol/l、塩化カルシウム 0.01mol/l、pH=7.5)25mlに溶解させた。これにアクチナーゼ-E(タンパク質分解酵素、科研製薬)50mgをトリス-塩酸・塩化カルシウム緩衝溶液5mlに溶かした溶液を加え、37℃で静置した。115時間後、この溶液を凍結乾燥した。この残留物をゲルろ過カラムクロマトグラフィーで2回精製し、目的のジシアロ糖鎖アスパラギン10を252mg得た。

【0045】

【化15】



【0046】

¹H-NMR (30°C) δ 5.13 (s, 1H, Man4-H-1), 5.07 (d, 1H, J=9.5Hz, GlcNAc1-H-1), 4.95 (s, 1H, Man4-H-1), 4.77 (s, 1H, Man3-H-1), 4.61 (d, 1H, J=7.6Hz, GlcNAc2-H-1), 4.60 (d, 2H, J=7.6Hz, GlcNAc5, 5-H-1), 4.44 (d, 2H, J=8.0Hz, Gal6, 6-H-1), 4.25 (bd, 1H, Man3-H-2), 4.20 (bdd, 1H, Man4-H-2), 4.12 (bd, 1H, Man4-H-2), 2.94 (dd, 1H, J=4.5Hz, 17.2Hz, Asn-βC H), 2.85 (dd, 1H, J=7.0Hz, 17.2Hz, Asn-βCH), 2.67, 2.66 (dd, 2H, J=4.6Hz, 12.4Hz, NeuAc7, 7-H-3_{eq}), 2.07 (s, 3H, Ac), 2.06 (s, 6H, Ac×2), 2.02 (s, 6H, Ac×2), 2.01 (s, 3H, Ac), 1.71 (dd, 2H, J=12.4Hz, 12.4Hz, NeuAc7, 7-H-3_{ax}

【0047】

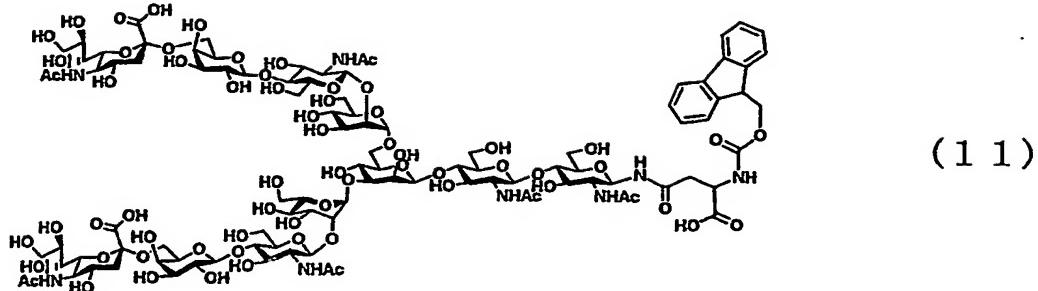
参考例2

Fmoc基でアスパラギンのアミノ基窒素を保護したジシアロ糖鎖アスパラギン(11)の合成

参考例1で得られたジシアロ糖鎖アスパラギン(10) 80mg (0.034mmol) を蒸留水 2.7mlとアセトン 4.1ml 混合溶液に溶解させ、これに9-フルオレニルメチル-N-スクシニミジルカーボネート(Fmoc-OSn) 34.7mg (0.103mmol) と炭酸水素ナトリウム 11.5mg (0.137mmol) を加え、室温で2時間攪拌した。TLCで反応終了を確認後この溶液を減圧濃縮し、アセトンを除去した。残渣をオクタデシルシリル基を結合したシリカゲルを充填したカラム (ODSカラム) にかけ精製し、目的のFmoc-ジシアロ糖鎖アスパラギン(11) 60.1mg 収率68%を得た。

【0048】

【化16】



【0049】

¹H-NMR (30°C)

8.01 (2H, d, J = 7.5 Hz, Fmoc), 7.80 (2H, d, J = 7.5 Hz, Fmoc), 7.60 (2H, dd, J = 7.5 Hz, Fmoc), 7.53 (2H, dd, J = 7.5 Hz, Fmoc), 5.23 (1H, s, Man 4-H₁), 5.09 (1H, d, J = 9.4 Hz, GlcNAc 1-H₁), 5.04 (1H, s, Man 4'-H₁), 4.86 (1H, s, Man 3-H₁), 4.70~4.66 (m, GlcNAc 2-H₁ GlcNAc 5, 5'-H₁), 4.54 (2H, d, J = 7.9 Hz, Gal 6, 6'-H₁), 4.44 (1H, d, Fmoc CH), 4.34 (1H, bd, Man 3-H₂), 4.29, (1H, bd, Man 4'-H₂), 4.20 (1H, bd, Man 4-H₂), 2.77 (2H, dd, NeuAc 7, 7'-H_{3eq}), 2.80 (1H, bdd, Asn-βCH), 2.62 (1H, bdd, Asn-βCH), 2.14 (18H, s×6, -Ac), 1.80 (2H, dd, NeuAc 7, 7'-H_{3ax})

【0050】

参考例3

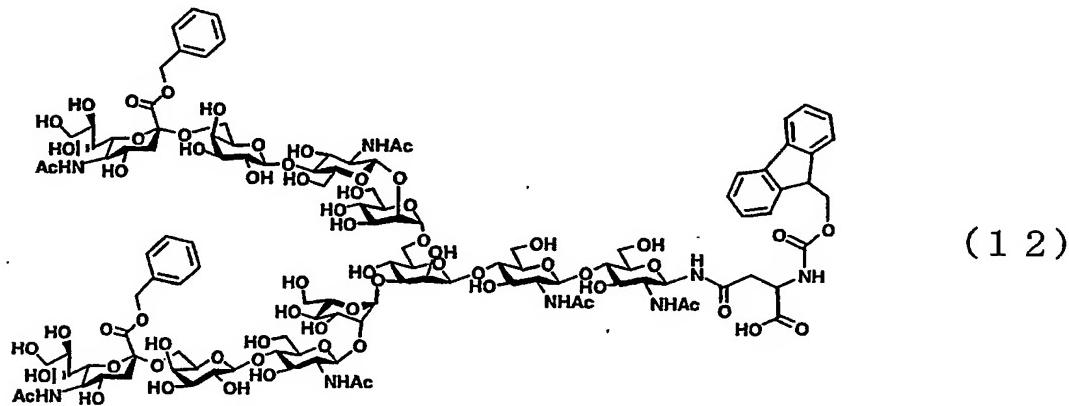
Fmoc 基でアスパラギンのアミノ基窒素が保護され、且つシアル酸のカルボキシル基がベンジル基で保護されたジシアロ糖鎖アスパラギン（12）の合成

4°Cに冷やしたDowex-50Wx8 (H⁺) のカラム (φ 0.5 cm × 5 cm) に、Fmoc-アスパラギン結合型二分岐糖鎖 (20 mg) の冷水溶液を流し、溶出した水溶液を凍結乾燥した。

得られたFmoc-アスパラギン結合型二分岐糖鎖を4℃の冷水に溶かし、これにCs₂CO₃水溶液(2.5mg/1ml)を加え水溶液のpHが5~6になるよう調整し、その後、糖鎖水溶液を凍結乾燥した。凍結乾燥後のFmoc-ジシアロ糖鎖試料を乾燥DMF(1.3ml)に溶かし、ベンジルプロミド(5.1μl)を加えてアルゴン気流下室温で45時間攪拌した。TLCで反応終了を確認後、反応溶液を0℃に冷やしジエチルエーテル10mlを加え目的物を析出させた。これをろ紙でろ過した。残った目的物に蒸留水を加えろ液として溶出させ、続いてこれを減圧濃縮した。得られた残渣をODSカラムにかけ精製し目的のジベンジルFmoc-ジシアロ糖鎖アスパラギン(12)18.2mg(収率85%)を得た。

【0051】

【化17】



【0052】

¹H-NMR (30℃),

7.90 (d, 2H, Fmoc), 7.70 (d, 2H, Fmoc), 7.53
- 7.40 (m, 9H, Bn, Fmoc), 5.36 (d, 2H, J=11.6,
Hz, CH₂), 5.30 (d, 2H, J=11.6 Hz, CH₂), 5.12 (
s, 1H, Man4-H₁), 4.99 (d, 1H, J=9.7 Hz, GlcNAc1-H₁),
4.93 (s, 1H, Man4'-H₁), 4.75 (s, 1H, Man3-H₁),
4.57 (m, 3H, GlcNAc2-H₁, GlcNAc5, 5'-H₁),
4.32 (d, 2H, Gal6, 6'-H₁), 4.24 (d,

, 1 H, Man3-H₂), 4.18 (d, 1 H, Man4' -H₂), 4.10 (1 H, d, Man4-H₂), 2.72 (bd, 1 H, Asn- β CH), 2.67 (dd, 2 H, NeuAc7, 7' -H_{3eq}), 2.51 (bdd, 1 H, Asn- β CH), 2.06 (s, 3 H, Ac), 2.03, 2.01 (each s, each 6 H, Ac×2), 1.89 (s, 3 H, Ac), 1.83 (2 H, dd, J=12.2, 12.2 Hz, NeuAc7, 7' -H_{3ax})

HRMS Calcd for C₁₁₇H₁₆₅N₈Na₂O₆₆ [M+N⁺] 2783.9597, found 2783.9501

【0053】

参考例4

特願2001-185685号に準じてモノシアロ糖鎖アスパラギンを得た。

【0054】

参考例5

HOOC-Val-Leu-Leu-Ala-NH₂ (13) の合成

I 樹脂（レジン）への導入

固相合成用カラムにWang レジン 1.6 gを入れ、メチレンクロライド、次いでメタノールで十分に洗浄し乾燥させた。Fmoc-Val 409.2 mg (1.2 mmol)、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール水和物 (HOBt·H₂O) 121.5 mg (0.9 mmol) をN,N-ジメチルアセトアミド (DM A) 4.5 mlに溶解させ、ジシクロヘキシリカルボジイミド (DCC) 247.5 mg (1.2 mmol) を加え、0℃で15分攪拌してアミノ酸溶液を得る。樹脂をDMFで膨潤させる。上記アミノ酸溶液を固相合成用カラムに入れ室温で17時間攪拌した。攪拌後、樹脂をメチレンクロライド、イソプロパノール、メタノールの順で洗浄し、乾燥させた。

乾燥させた樹脂をカラム内でDMFで膨潤させた後、20%ピペリジン/DMF溶液約10 mlを加え、室温で15分間攪拌してFmoc基を脱保護してレジン-Val-NH₂を得た。次いでDMFで洗浄し、乾燥させた。

【0055】

II ペプチド鎖の伸長

乾燥させた樹脂（レジン-Va1-NH₂）をカラム内でDMFで膨潤させた後、Fmoc-Leu 318.6 mg (0.9 mmol)、HOBT・H₂O 121.5 mg (0.9 mmol) を加え樹脂が浸るくらいにDMFを加えた。ジイソプロピルカーボジイミド (DIPCDI) 138.5 μl (0.9 mmol) を加え、室温で2時間攪拌した。攪拌後、DMFで洗浄し、乾燥させた。

乾燥させた樹脂をカラム内でDMFで膨潤させた後、20%ピペリジン/DMF溶液約10mlを加え、室温で15分間攪拌してFmoc基を脱保護してレジン-Va1-Leu-NH₂を得た。次いでDMFで洗浄し、乾燥させた。

乾燥させた樹脂をカラム内でDMFで膨潤させた後、Fmoc-Leu 318.6 mg (0.9 mmol)、HOBT・H₂O 121.5 mg (0.9 mmol) を加え樹脂が浸るくらいにDMFを加えた。DIPCDI 138.5 μl (0.9 mmol) を加え、室温で2時間攪拌した。攪拌後、DMFで洗浄し、乾燥させた。

乾燥させた樹脂をカラム内でDMFで膨潤させた後、20%ピペリジン/DMF溶液約10mlを加え、室温で15分間攪拌してFmoc基を脱保護してレジン-Va1-Leu-Leu-NH₂を得た。次いでDMFで洗浄し、乾燥させた。

乾燥させた樹脂をカラム内でDMFで膨潤させた後、Fmoc-Ala 293.4 mg (0.9 mmol)、HOBT・H₂O 121.5 mg (0.9 mmol) を加え樹脂が浸るくらいにDMFを加えた。DIPCDI 138.5 μl (0.9 mmol) を加え、室温で2時間攪拌した。攪拌後、DMFで洗浄し、乾燥させた。

乾燥させた樹脂をカラム内でDMFで膨潤させた後、20%ピペリジン/DMF溶液約10mlを加え、室温で15分間攪拌してFmoc基を脱保護してレジン-Va1-Leu-Leu-Ala-NH₂を得た。次いでDMFで洗浄し、乾燥させた。

【0056】

III 固相からの切り出し

HOOC-Va1-Leu-Leu-Ala-NH₂の合成

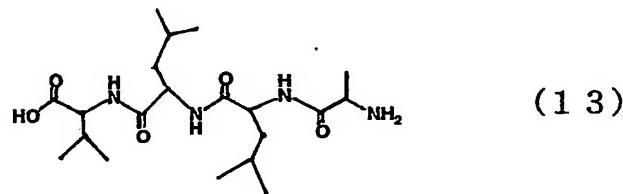
乾燥させた樹脂にTFA 95%水溶液を加え、室温で3時間攪拌した。攪拌後、溶液をナスフラスコに移し取り氷中でジエチルエーテルを加え、目的物を沈殿させ、これをろ過した。

¹H-NMR (30°C)

8.56 (1H, d, J=6.5Hz, Leu-2NH), 8.42 (1H, d, J=7.4Hz, Leu-1NH), 8.25 (1H, d, J=8.3Hz, Val-NH), 4.34 (1H, d, J=6.7Hz, Val- α), 4.16 (1H, d, J=7.1Hz, Ala- α), 2.27 (1H, ddd, Val- β), 1.69~1.58 (m, 11H, Leu-1, Leu-2), 1.59 (3H, d, J=7.2Hz, Ala- β), 1.01~0.96 (m, 25H, Leu-1, Leu-2, Val)

【0057】

【化18】



【0058】

実施例1

参考例4の固相から切り出す前の乾燥したレジン-Val-Leu-Leu-Ala-NH₂からなる樹脂 17mgをエッペンチューブに取った。参考例3で得られたジベンジルFmoc-ジシアロ糖鎖アスパラギン(12) 35mg (14.8 μ mol)とO-(7-アザベンゾトリアゾール-1-yl)-1,1,3,3-テトラメチルウロニウムヘキサフルオロホスホネート(HATU) 0.64mg (2.7 μ mol)を加え、DMFを150 μ l加えた。ジイソプロピルエチルアミン(DIPEA) 0.31 μ lを加え、室温で24時間攪拌した。攪拌後、DMFで洗浄し乾燥させた。

乾燥させた樹脂をエッペンチューブ内で膨潤させた後、20%ピペリジン/D

MF溶液約1mlを加え、室温で15分間攪拌し攪拌してFmoc基を脱保護してレジン-Va1-Leu-Leu-Ala-Asn(oligo)-NH₂を得た。次いでDMFで洗浄し、乾燥させた。ここでAsn(oligo)とは参考例3で得られたジベンジルFmoc-ジシアロ糖鎖アスパラギン(12)からFmoc基の脱離したジベンジルジシアロ糖鎖アスパラギンである。

(固相からの切り出し)

HOOOC-Va1-Leu-Leu-Ala-Asn(oligo)-NH₂の合成

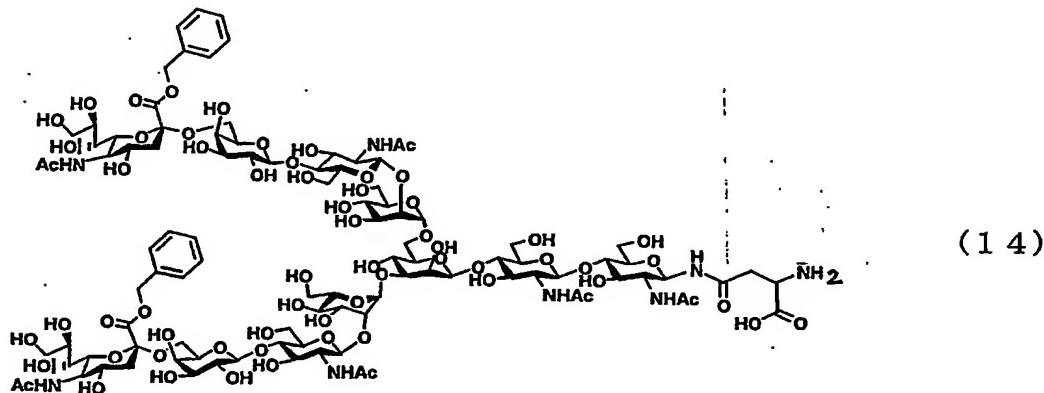
乾燥させた上記樹脂にトリフルオロ酢酸(TFA)95%水溶液を加え、室温で3時間攪拌した。攪拌後、溶液をエッペンチューブに移し取り氷中でジエチルエーテルを加え、目的物を沈殿させた。沈殿物を0.1%TFA水溶液に溶かし、逆相カラムクロマトグラフィーで精製した。(YMC-Pack ODS-A 250×3.0mm 流速0.45ml/min 展開溶媒A:0.1%TFA水溶液 B:0.1%TFA アセトニトリル:水=90:10を用いた。

グラジエント Aのみ10分 A100%→B100% 30分),

上記Asn(oligo)の構造を下記に示す。

【0059】

【化19】



【0060】

¹H-NMR (30°C)

7.59~7.55 (m, 10H, Bn), 5.45 (4H, dd, Bn-CH? ×2), 5.23 (1H, s, Man4-H₁), 5.15 (1H, d, GlcN

A c 1-H₁), 5.03 (1H, s, M a n 4'-H₁), 4.87 (1H, s, M a n 3-H₁), 4.67 (3H, d, G l c N A c 2-H₁, G l c N A c 5, 5'-H₁), 4.42 (2H, d, G a l 6, 6'-H₁), 4.34 (1H, d, M a n 3-H₂), 4.28 (1H, d, M a n 4'-H₂), 4.20 (1H, d, M a n 4-H₂), 2.82 (2H, dd, J=6.68 Hz, N e u A c 7, 7'-H₃ e q), 2.65 (1H, dd, J=16.69 Hz, 6.83 Hz, A s n-β C H), 2.13 (18H, s×6, -A c), 1.94 (2H, dd, J=12.24 Hz, N e u A c 7, 7'-H₃ a x), 1.41 ~1.26 (m, 25H, L e u-1, L e u-2, V a 1)

【0061】

実施例2

H O O C-S e r-S e r-A s n (o l i g o)-N H₂ の合成

I 樹脂（レジン）への導入

固相合成用カラムにP E G A レジン 50 m g を入れ、メチレンクロライド、次いでメタノールで十分に洗浄し乾燥させた。

F m o c-S e r (B z 1)-O H 80 m g (180 μ m o l)、H O B t · H₂O 19 m g (135 μ m o l) をD M F 10 m l に溶解させ、D C C 37 m g (180 μ m m o l) を加え、0℃で15分攪拌してアミノ酸溶液を得る。樹脂をD M F で膨潤させる。上記アミノ酸溶液を固相合成用カラムに入れ室温で17時間攪拌した。攪拌後、樹脂をメチレンクロライド、イソプロパノール、メタノールの順で洗浄し、乾燥させた。

乾燥させた樹脂をカラム内でD M F で膨潤させた後、20%ピペリジン/D M F 溶液約2.0 m l を加え、室温で15分間攪拌してF m o c 基を脱保護してレジン-S e r-N H₂を得た。次いでイソプロパノールとD M F で洗浄し、乾燥させた。

【0062】

II ペプチド鎖の伸長

乾燥させた樹脂をカラム内でD M F で膨潤させた後、F m o c-S e r (B z 1)-O H 40.0 m g (89.8 μ m o l)、H O B t · H₂O 12 m g (

$89.8 \mu\text{mol}$ ）を加えDMF 2.0 ml 加えた。DIPCDI $14 \mu\text{l}$ ($89.8 \mu\text{mol}$) を加え、室温で2時間攪拌した。攪拌後、DMFで洗浄し、乾燥させた。

乾燥させた樹脂をカラム内でDMFで膨潤させた後、20%ピペリジン/DMF溶液約2.0 mlを加え、室温で15分間攪拌してFmoc基を脱保護してレジン-Ser-Ser-NH₂を得た。次いでイソプロパノールとDMFで洗浄し、乾燥させた。

乾燥させた樹脂をカラム内でジメチルスルホキシド(DMSO)で膨潤させた後、参考例3で得られたジベンジル-Fmoc-ジシアロ糖鎖アスパラギン(12) 13.5 mg ($5.7 \mu\text{mol}$) をDMFに溶かしカラムに移し入れた。これにHATU 1.6 mg ($6.8 \mu\text{mol}$) とDIPEA $0.83 \mu\text{l}$ を加え、室温で24時間攪拌した。攪拌後、イソプロパノールとDMFで洗浄し乾燥させた。

乾燥させた樹脂をエッペンチューブ内で膨潤させた後、20%ピペリジン/DMF溶液約1mlを加え、室温で15分間攪拌し、Fmoc基を脱保護してレジン-Ser-Ser-Asn(oligo)-NH₂を得た。次いでDMFで洗浄し、乾燥させた。ここでAsn(oligo)は実施例1のものと同じものである。

【0063】

III 固相からの切り出し

乾燥させた樹脂にTFA 95%水溶液を加え、室温で3時間攪拌した。反応溶液を、逆相カラムクロマトグラフィーで精製した。(YMC-Pack ODS-A $250 \times 3.0 \text{ mm}$ 流速 0.35 ml/min 展開溶媒 A: 0.1% TFA水溶液 B: 0.1% TFA アセトニトリル:水 = 90:10を用いた。 グラジェントA $100\% \rightarrow B 100\%$ 120分),

¹H-NMR (30°C)

7.60~7.45 (m, 20H, Bn), 5.35 (4H, dd, J = 11.8 Hz, Bn-CH₂-), 5.21 (1H, s, Man₄-H₁), 5.13 (1H, d, J = 9.2 Hz, GlcNAc₁-H₁), 5.03 (1H, s, Man

4' -H₁), 4.34 (1H, d, Man3-H₂), 4.28 (1H, d, Man4'-H₂), 4.20 (1H, d, Man4-H₂), 2.82 (2H, d d, J=6.68Hz, NeuAc7, 7'-H_{3eq}), 2.13 (18H, s ×6, -Ac), 1.93 (2H, dd, J=12.24Hz, NeuAc7, 7'-H_{3ax})

【0064】

実施例3

HOOOC-Ser-Ser-Asn (disialooligo)-Val-Leu-Leu-Ala-NH₂ の合成

上記目的糖ペプチドにおけるAsn (disialooligo) とは、ベンジル基で保護されていないシアル酸を有するジシアロオリゴアスパラギンを意味する。

固相合成用カラムにHMPA-PEGAレジン50mgを入れ、CH₂Cl₂, DMFで十分に洗浄し乾燥させた。

Fmoc-Ser (OtBu)-OH、1-メチレンスルホニル-3-ニトロ-1,2,4-トリアゾール (MSNT), N-メチルイミダゾールをCH₂Cl₂に溶解させ5分間攪拌した後、樹脂の入った固相合成用カラムに入れ室温で3時間攪拌した。攪拌後、樹脂をメチレンクロライド、イソプロパノール、DMFで洗浄し乾燥させた。その後、20分間20%無水酢酸DMF溶液を用いて固相上の未反応のアミノ基をアセチル化しキャッピングした。DMFで樹脂を洗浄後、20%ピペリジン/DMF溶液を用いて20分攪拌することによりFmoc基を脱保護しレジン-Ser-NH₂を得た。DMFで洗浄後、乾燥させた。

【0065】

次に、Fmoc-Ser (OtBu)-OHを用いHOBt·H₂OとDIPCDIによって縮合させた。

次に、参考例3で得られたジベンジルFmoc-ジシアロ糖鎖アスパラギン(12)をDMSO、DMF 1対1の混合溶媒に溶かし、HATUとDIPEAを用いて室温24時間攪拌させて縮合させた。DMFで洗浄後10%無水酢酸/2-プロパノール:メタノールで20分間攪拌しキャッピングした。樹脂を2-ブ

ロパノール、DMFで洗浄後、20%ピペリジン/DMFで20分間攪拌しFmoc基を脱保護しDMFで樹脂を洗浄した。

この樹脂に、バリン(Val)、ロイシン(Leu)、ロイシン(Leu)、アラニン(Ala)を同様に縮合およびFmoc基の脱保護を行って、レジン-Ser-Ser-Asn(ジベンジルdisialooligo)-Val-Leu-Leu-Ala-NH₂を得た。ここでAsn(ジベンジルdisialooligo)とは、ベンジル基で保護されたシアル酸を有するジシアロオリゴアスパラギンを意味する。

バリン(Val)、ロイシン(Leu)、アラニン(Ala)のアミノ酸はカルボキシル基をpfpエステル化したFmoc-AA-Opfp(AA=アミノ酸)を用い、3,4-ジヒドロ-4-オキソ-1,2,3-ベンゾトリアジン-3-yl(Dhb t)によって縮合させた。すべての縮合はDMF溶液中で行った。

縮合が終了した樹脂をよく乾燥した後、95%TFA水溶液を加え、室温で3時間攪拌してレジンを切断した。レジンをろ過して除き、反応溶液を室温で減圧濃縮した後、水に溶かし凍結乾燥した。凍結乾燥品をpH11の水酸化ナトリウム水溶液に溶かし、ベンジルエステルを加水分解してベンジルを脱離した後、酢酸で中和しそのまま凍結乾燥した。凍結乾燥品をHPLCで精製することで目的とするHOOC-Ser-Ser-Asn(disialooligo)-Val-Leu-Leu-Ala-NH₂を得た。

(YMC-Pack ODS-A 250×3.0mm 展開溶媒 A:0.1%TFA水溶液 B:0.1%TFA アセトニトリル:水=90:10 グラジエントA 100% 0.35ml/min→B 100% 0.40ml/min 90分 流速0.35ml/minから0.40ml/min)

【0066】

¹H-NMR (30°C)

δ 5.22 (s, 1H, Man4-H1), 5.11 (d, 1H, GlcNAc1-H1), 5.04 (s, 1H, Man4'-H1), 4.86 (1H, Asnα), 4.70 (bd, 3H, GlcNAc2, 5, 5'-H1), 4.62-4.

5.7 (m, 2 H, Ser α \times 2), 4.53 (d, 2 H, Gal 6, 6' -H1), 4.52-4.48 (m, 2 H, Leu α \times 2), 4.34 (bs, 1 H, Man 3-H2), 4.28 (bs, 1 H, Man 4-H2), 4.21-4.15 (m, 3 H, Man 4' -H2, Val α , Ala α), 2.98 (dd, 1 H, Asn β), 2.86 (dd, 1 H, Asn β), 2.75 (bdd, 2 H, NeuAc 7, 7' -H3eq), 2.16-2.10 (Ac \times 6, Val β), 1.82 (dd, 2 H, NeuAc 7, 7' -H3ax), 1.76-1.68 (bd, 6 H, Leu β CH₂ \times 2, Leu γ CH \times 2), 1.60 (d, 3 H, Ala β CH₃), 1.03-0.97 (m, 18 H, Leu-CH₃ \times 4, Val-CH₃ \times 2)

【0067】

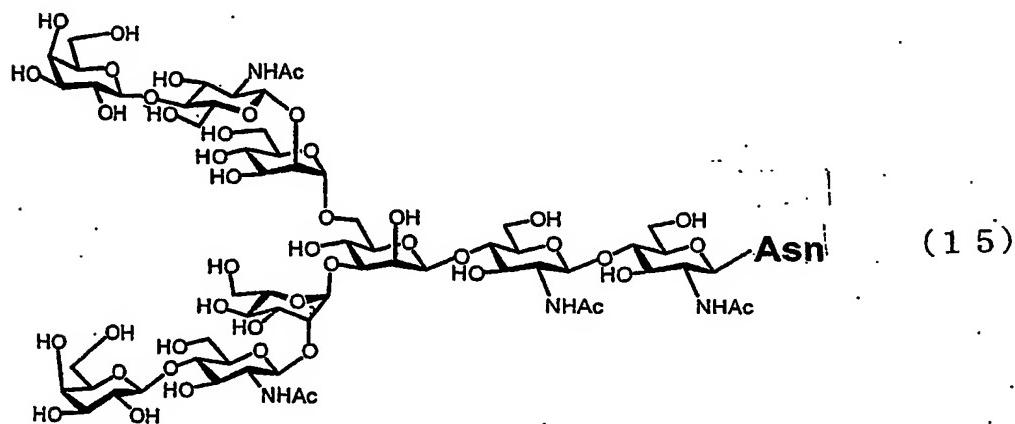
実施例 4

HOOOC-Ser-Ser-Asn (dissialooligo) -Val-Leu-Leu-Ala-Asn (asialooligo) -Val-Leu-Leu-Ala-NH₂ の合成

上記目的糖ペプチドにおけるAsn (asialooligo) とは、下記で示される糖鎖アスパラギンである。

【0068】

【化 20】



[0069]

実施例3の固相から切り出す前のレジン-Ser-Ser-Asn（ジベンジルdisialooligo）-Val-Leu-Leu-Ala-NH₂に、更にAsn（asialooligo）、バリン（Val）、ロイシン（Leu）、ロイシン（Leu）、アラニン（Ala）を用いて縮合させ、次いで実施例3と同様にペプチド鎖を固相から切り出し、次いでベンジル基を脱離してHOOC-Ser-Ser-Asn（disialooligo）-Val-Leu-Leu-Ala-Asn（asialooligo）-Val-Leu-Leu-Ala-NH₂からなる糖ペプチドを得た。

バリン（Val）、ロイシン（Leu）、アラニン（Ala）のアミノ酸はカルボキシル基をpfpエステル化したFmoc-AA-Ofp（AA=アミノ酸）を用い、3,4-ジヒドロ-4-オキソ-1,2,3-ベンゾトリアジン-3-yl（Dhb t）によって縮合させた。すべての縮合はDMF溶液中で行った。そして20%ピペリジン/DMF溶液を加え室温20分攪拌しFmoc基を脱保護した。

糖鎖アスパラギンの次にくるアミノ酸（Val）を導入後は20%無水酢酸/DMF溶液でキャッピングした後にFmoc基の脱保護を行った。樹脂をイソブロパノールとDMF洗浄し、乾燥した。Fmoc-アシアロ糖鎖アスパラギンの縮合は、実施例3のジベンジルFmoc-ジシアロ糖アスパラギンの縮合と同様に行った。

【0070】

得られたHOOC-Ser-Ser-Asn（disialooligo）-Val-Leu-Leu-Ala-Asn（asialooligo）-Val-Leu-Leu-Ala-NH₂からなる糖ペプチドの¹H-NMR(30°C)を以下に示す。

δ 5.22, 5.21 (each s, each 1H, Man4-H1, ManD-H1), 5.11 (d, 2H, GlcNAc1-H1, GlcNAcA-H1), 5.03, 5.01 (each s, each 1H, Man4'-H1, ManD'-H-1), 4.86 (2H, Asn α), 4.69-4.66 (GlcNAc2, B, 5, 5', E, E'-H1), 4.61-4.48 (Leu α

$\times 4$, Ser $\alpha \times 2$, Gal6, 6', F, F' -H1), 4.33 (bs, 2H, Man3, C-H2), 4.28 (bs, 2H, Man4, D-H2), 4.20 (bs, 2H, Man4', D' -H2), 4.20-4.17 (Val $\alpha \times 2$, Ala $\alpha \times 2$), 3.00 (dd, 2H, Asn $\beta \times 2$), 2.83 (dd, 2H, Asn $\beta \times 2$), 2.76 (dd, 2H, NeuAc7, 7' -H3eq), 1.82 (dd, 2H, NeuAc7, 7' -H3ax), 2.16-2.10 (Ac $\times 10$, Val β), 1.70-1.60 (m, Leu β , γ), 1.60, 1.49 (each d, each 3H, Ala β), 1.02-0.96 (m, 36H, Val-CH $_3 \times 4$, Leu-CH $_3 \times 8$)

【0071】

参考例6

上記Asn (asialooligo) で示される糖鎖アスパラギンは、特願2001-185685号の実施例に準じて合成した。そのNMRデータを下記に示す。

$^1\text{H-NMR}$ (30°C)

δ 5.12 (s, 1H, Man4-H-1), 5.07 (d, 1H, J = 9.7 Hz, GlcNAc1-H-1), 4.92 (s, 1H, Man4' -H-1), 4.76 (s, 1H, Man3-H-1), 4.62 (d, 1H, J = 8.0 Hz, GlcNAc2-H-1), 4.58 (d, 2H, J = 7.8 Hz, GlcNAc5, 5' -H-1), 4.47 (d, 2H, J = 7.9 Hz, Gal6, 6' -H-1), 4.24 (bd, 1H, Man3-H-2), 4.19 (bdd, 1H, J = 3.2 Hz, 1.4 Hz, Man4' -H-2), 4.12 (bdd, 1H, J = 3.2 Hz, 1.4 Hz, Man4 -H-2), 2.93 (dd, 1H, J = 4.5 Hz, 17.0 Hz, Asn- β CH), 2.93 (dd, 1H, J = 6.8 Hz, 17.0 Hz, Asn- β CH), 2.08 (s, 3H, Ac), 2.05 (s, 6H, Ac $\times 2$), 2.01 (s, 3H, Ac)

【0072】

【発明の効果】

本発明によれば、少なくとも1以上の糖鎖アスパラギンまたはムチン結合型糖

鎖をペプチド鎖の任意の位置に有する糖ペプチドを人工的に容易に大量に合成可能な糖ペプチドの製造法を提供することができる。

また本発明によれば、シアル酸を有する糖鎖アルパラギンであっても、酸処理によってシアル酸が糖ペプチドから切断されず、容易にシアリル糖ペプチドを得ることができる。

また本発明によれば、糖残基が任意に除去（欠失）された各種の新規な糖鎖アスパラギンの少なくとも1以上をペプチド鎖の任意の位置に有する糖ペプチドを人工的に容易に大量に合成可能である。

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 少なくとも 1 以上の糖鎖アスパラギンまたはムチン結合型糖鎖をペプチド鎖の任意の位置に有する糖ペプチドを人工的に容易に大量に合成可能な糖ペプチドの製造法、及びその糖ペプチドを提供する。

【解決手段】 (1) 水酸基を有する樹脂（レジン）の水酸基と、脂溶性保護基でアミノ基を保護されたアミノ酸のカルボキシル基をエステル化反応させ、
(2) 上記脂溶性保護基を脱離して遊離アミノ基を形成させ、
(3) この遊離アミノ基と、脂溶性保護基でアミノ基を保護されたアミノ酸のカルボキシル基とアミド化反応させ、
(4) 上記脂溶性保護基を脱離して遊離アミノ基を形成させ、
(5) 上記(3) 及び(4) の工程を 1 回以上繰り返し、
(6) 脂溶性保護基でアミノ基を保護された糖鎖アスパラギンのアスパラギン部分のカルボキシル基とアミド化反応させ、
(7) 上記脂溶性保護基を脱離して遊離アミノ基を形成させ、
(8) この遊離アミノ基と、脂溶性保護基でアミノ基を保護されたアミノ酸のカルボキシル基とアミド化反応させ、
(9) 上記(7) 及び(8) の工程を 1 回以上繰り返し
(10) 上記脂溶性保護基を脱離して遊離アミノ基を形成させ、
(11) 酸で樹脂（レジン）を切断することを特徴とする少なくとも 1 以上の糖鎖アスパラギンをペプチド鎖の任意の位置に有する糖ペプチドの製造法、及びその糖ペプチド。

【選択図】 なし

認定・付加情報

特許出願の番号	特願2002-196821
受付番号	50200986912
書類名	特許願
担当官	第五担当上席 0094
作成日	平成14年 7月11日

<認定情報・付加情報>

【提出日】	平成14年 7月 5日
-------	-------------

次頁無

認定・付加情報

特許出願の番号	特願2002-196821
受付番号	50200986912
書類名	特許願
担当官	小菅 博 2143
作成日	平成15年 6月30日

<認定情報・付加情報>

【提出日】	平成14年 7月 5日
【特許出願人】	
【識別番号】	502244258
【住所又は居所】	神奈川県横浜市都筑区牛久保東2-4-2-20 5
【氏名又は名称】	梶原 康宏
【特許出願人】	
【識別番号】	000206901
【住所又は居所】	大阪府大阪市中央区大手通3丁目2番27号
【氏名又は名称】	大塚化学ホールディングス株式会社
【代理人】	申請人
【識別番号】	100081536
【住所又は居所】	大阪府豊中市寺内1丁目9番22号 田村特許事務所
【氏名又は名称】	田村 巍

【書類名】 出願人名義変更届（一般承継）

【あて先】 特許庁長官殿

【事件の表示】

【出願番号】 特願2002-196821

【承継人】

【識別番号】 302060306

【氏名又は名称】 大塚化学株式会社

【代表者】 森 明平

【承継人代理人】

【識別番号】 100081536

【弁理士】

【氏名又は名称】 田村 巍

【電話番号】 06-6864-3137

【提出物件の目録】

【物件名】 承継証明書 1

【提出物件の特記事項】 手続補足書により提出する

【物件名】 履歴事項全部証明書 1

【提出物件の特記事項】 手続補足書により提出する

【包括委任状番号】 0301202

【プルーフの要否】 要

認定・付加情報

特許出願の番号	特願2002-196821
受付番号	50300813920
書類名	出願人名義変更届（一般承継）
担当官	小菅 博 2143
作成日	平成15年 6月30日

<認定情報・付加情報>

【提出日】	平成15年 5月16日
-------	-------------

特願 2002-196821

出願人履歴情報

識別番号

[000206901]

1. 変更年月日 1990年 8月21日
[変更理由] 新規登録
住 所 大阪府大阪市中央区大手通3丁目2番27号
氏 名 大塚化学株式会社
2. 変更年月日 2003年 1月14日
[変更理由] 名称変更
住 所 大阪府大阪市中央区大手通3丁目2番27号
氏 名 大塚化学ホールディングス株式会社

特願2002-196821

出願人履歴情報

識別番号

[502244258]

1. 変更年月日 2002年 7月 5日
[変更理由] 新規登録
住 所 神奈川県横浜市都筑区牛久保東2-4-2-205
氏 名 梶原 康宏

特願2002-196821

出願人履歴情報

識別番号 [302060306]

1. 変更年月日 2002年10月15日
[変更理由] 新規登録
住 所 大阪府大阪市中央区大手通3丁目2番27号
氏 名 大塚化学株式会社